



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102574067 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 11

(21) 申请号 201080043816. 2

(22) 申请日 2010. 09. 16

(30) 优先权数据

10-2009-0093184 2009. 09. 30 KR

10-2010-0078667 2010. 08. 16 KR

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 03. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/KR2010/006358 2010. 09. 16

(87) PCT申请的公布数据

W02011/040718 KO 2011. 04. 07

(71) 申请人 阿莫麦迪有限公司

地址 韩国首尔

申请人 阿莫绿色技术有限公司

(72) 发明人 鞠重基 赵纪云 金灿 徐尚哲

金哲贤 徐寅踊 李承勳 金允諲

朴奏映

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 阴亮

(51) Int. Cl.

B01D 67/00 (2006. 01)

B01D 71/00 (2006. 01)

C08J 7/12 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

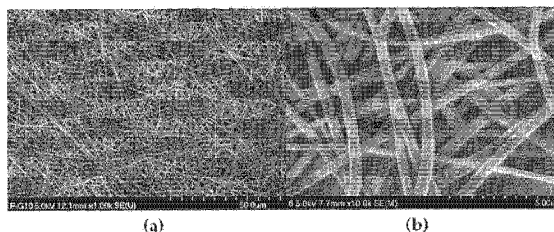
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 6 页

(54) 发明名称

用于 Western 印迹的纳米纤维膜及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及用于 Western 印迹的纳米纤维膜及其制备方法,例如,该用于 Western 印迹的纳米纤维膜的三维开放式孔通道结构的平均孔径为 $0.1\mu\text{m}$ 至 $1.0\mu\text{m}$ 且厚度为 $30\mu\text{m}$ 至 $200\mu\text{m}$,该用于 Western 印迹的膜通过使用由电纺丝获得的平均纤维直径为 50nm 至 1000nm 的纳米纤维经过热板压延过程而制备。所述方法包括如下步骤:将疏水性材料溶解于溶剂中以制备纺丝溶液;使该纺丝溶液经过纺丝过程以获得疏水性聚合物纳米纤维网;以及压延获得的纳米纤维网以获得用于 Western 印迹的膜。



1. 制备用于 Western 印迹的膜的方法,所述方法包括如下步骤:
将疏水性聚合物溶解于溶剂中以制备纺丝溶液;
使所述纺丝溶液经过纺丝过程以获得疏水性聚合物纳米纤维网;以及
将获得的所述纳米纤维网压延以获得用于 Western 印迹的膜。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其还包括进行表面改性以赋予经压延的纳米纤维网亲水性的步骤。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述疏水性聚合物材料为选自聚偏 1,1-二氟乙烯 (PVdF)、尼龙、硝化纤维素、聚氨基甲酸酯 (PU)、聚碳酸酯 (PC)、聚苯乙烯 (PS)、聚乳酸 (PLA)、聚丙烯腈 (PAN)、聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA)、聚乙烯亚胺 (PEI)、聚甲基吡丙啶 (PPI)、聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA)、聚氯乙烯 (PVC)、聚乙烯乙酸酯 (PVAc) 和聚苯乙烯二乙烯基苯共聚物中的一种或者两种或多种的混合物。
4. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述溶剂选自二甲基甲酰胺 (DMF)、二甲基乙酰胺 (DMAc)、四氢呋喃 (THF)、丙酮、乙醇、氯仿、二甲基亚砷 (DMSO)、二氯甲烷、乙酸、甲酸、N-甲基吡咯烷酮 (NMP)、氟代醇和水中的一种或多种。
5. 如权利要求 1 所述的方法,其中形成所述纳米纤维网的纳米纤维的直径为 50nm 至 1000nm。
6. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述纺丝过程选自电纺丝、电雾化、电吹制纺丝、离心电纺丝、快速电纺丝、气泡电纺丝、熔融电纺丝和非针电纺丝中的任一种。
7. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述压延通过选自压缩、加压、热板压延、滚压、热粘合、超声波粘合、缝口密封带法和层压中的任一过程而进行。
8. 如权利要求 1 所述的方法,其中基于所述纺丝溶液的总重量,所述疏水性聚合物材料的量为 5%重量比至 90%重量比。
9. 如权利要求 1 所述的方法,其中进行所述压延步骤时在 60°C 至 200°C 下进行热处理。
10. 如权利要求 2 所述的方法,其中通过等离子处理进行所述表面改性。
11. 如权利要求 10 所述的方法,其中使用氧气或氩气进行所述等离子处理。
12. 如权利要求 10 所述的方法,其中将所述等离子处理进行 30 秒至 300 秒。
13. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述膜的平均孔径为 0.1 μm 至 1.0 μm 、厚度为 30 μm 至 200 μm 以及孔隙率大于等于 60%。
14. 根据权利要求 1 至 13 中任一权利要求制备的用于 Western 印迹的膜。

用于 Western 印迹的纳米纤维膜及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于 Western 印迹的膜及其制备方法,所述膜所具有的三维开放式孔结构的平均孔径为 $0.1\ \mu\text{m}$ 至 $1.0\ \mu\text{m}$ 以及其厚度为 $30\ \mu\text{m}$ 至 $200\ \mu\text{m}$,其中该用于 Western 印迹的膜通过使由电纺丝而获得的平均纤维直径为 50nm 至 1000nm 的纳米纤维经过热板压延过程而制备。

背景技术

[0002] 目前常用的用于 Western 印迹的膜包括由硝化纤维 (NC)、尼龙或聚偏 1,1-二氟乙烯 (下文称为“PVdF”) 聚合物制成的多孔膜。

[0003] 特别地,基于 PVdF 的膜主要用作 Western 印迹用膜,因为它们与基于硝化纤维或基于尼龙的膜相比具有优异的蛋白结合灵敏性、膜强度和操作性质。

[0004] Western 印迹是用于检测组织均浆或提取物的给定样品中特异性蛋白的技术。其为用于从各种蛋白混合物中检测任何特异性蛋白的技术,并且是通过使用抗待检测蛋白的抗体来引起抗原-抗体反应从而检测蛋白存在的方法。

[0005] Western 印迹还用于通过多肽或蛋白三维结构的尺寸来分离天然凝胶或变性蛋白。

[0006] 在 Western 印迹中,将从细胞或组织中提取的蛋白与样品缓冲液混合,并放置在由丙烯酰胺制成的分子筛上,然后进行电泳。然后,在样品缓冲液中包含的十二烷基硫酸钠 (SDS) 使蛋白携带负 (-) 电荷,以便蛋白被吸引至正 (+) 电荷。同时,SDS 分子筛干涉蛋白移动,从而小分子快速移动并且大分子慢速移动,因此形成各种尺寸的带。当将膜放置在根据尺寸而分离的凝胶上并在其上施加电流时,蛋白转移至膜。抗待检测的特异性蛋白的抗体与膜结合,然后对该抗体特异性的第二抗体与该膜结合,并且通过 X 射线将生成的显色反应成像。

[0007] 用于该目的的膜为多孔膜,其由能与蛋白疏水作用的聚合物 (例如,PVdF) 制成并具有 $0.2\ \mu\text{m}$ 至 $0.45\ \mu\text{m}$ 的平均孔径。

[0008] 该多孔膜由诸如通过相分离的湿法、干法或干-湿法浇铸的方法而制备,其中将溶剂和聚合物引入诸如水的纳米溶剂中。然而,多孔膜制备的成本高并且难于大量制备。

[0009] 此外,若多孔膜通过相分离而制备,则缺点在于孔结构分布不均匀。例如,PVdF 膜需要在使用前通过将其浸入甲醇中来进行使膜部分亲水化的过程,由此使膜与缓冲溶液的相容性最大化。若不进行该亲水化过程,则由于蛋白未充分地吸收在膜上而降低膜的灵敏性。

[0010] 该甲醇预处理过程能显著降低膜的强度而导致裂缝并形成导致背景的气泡,因此使其难于准确地检测期望的蛋白。

[0011] 因此,本发明人已使用电纺丝过程来以简单且便捷的方式制备昂贵的纳米纤维膜,其为具有人工可控的孔结构,并由具有最大表面积的纳米纤维制成且甚至在其未经过甲醇预处理过程时与现有膜相比具有优异的灵敏性,由此完成了本发明。

[0012] 发明概述

[0013] 技术问题

[0014] 因此,本发明的目的是提供用于 Western 印迹的膜及其制备方法,所述膜使用电纺丝过程而制备、由具有最大表面积 of 纳米纤维网组成以消除对甲醇预处理过程的需求,并由此具有无背景的优异灵敏性。

[0015] 本发明的另一目的是提供用于 Western 印迹的膜及其制备方法,所述膜由于通过进行等离子表面改性来使膜亲水化而具有更优异的灵敏性。

[0016] 技术方案

[0017] 为实现上述目的,根据本发明的一个方面,提供了制备用于 Western 印迹的膜的方法,所述方法包括如下步骤:将疏水性聚合物材料溶解在溶剂中以制备纺丝溶液;使纺丝溶液经历纺丝过程以获得疏水性聚合物纳米纤维网;以及将纳米纤维网压延以获得用于 Western 印迹的膜。

[0018] 本发明的方法还包括进行表面改性以赋予压延的纳米纤维网亲水性的步骤。

[0019] 用于本发明的疏水性聚合物材料可以为例如选自聚偏 1,1-二氟乙烯 (PVdF)、尼龙、硝化纤维素、聚氨基甲酸酯 (PU)、聚碳酸酯 (PC)、聚苯乙烯 (PS)、聚乳酸 (PLA)、聚丙烯腈 (PAN)、聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA)、聚乙烯亚胺 (PEI)、聚甲基吡丙啶 (PPI)、聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA)、聚氯乙烯 (PVC)、聚乙烯乙酸酯 (PVAc) 和聚苯乙烯二乙烯基苯共聚物中的一种或者两种或多种的混合物。

[0020] 用于本发明的溶剂可以为选自二甲基甲酰胺 (DMF)、二甲基乙酰胺 (DMAc)、四氢呋喃 (THF)、丙酮、乙醇、氯仿、二甲基亚砷 (DMSO)、二氯甲烷、乙酸、甲酸、N-甲基吡咯烷酮 (NMP)、氟代醇和水中的一种或多种。

[0021] 形成纳米纤维网的纳米纤维的直径优选为 50nm 至 1000nm。

[0022] 纺丝过程可以选自电纺丝、电雾化、电吹制纺丝、离心电纺丝、快速电纺丝、气泡电纺丝、熔融电纺丝和非针电纺丝中的任一种。

[0023] 压延通过选自压缩、加压、热板压延 (hot-plate calendering)、滚压、热粘合、超声波粘合、缝口密封带法和层压中的任一过程而进行。

[0024] 相对于纺丝溶液的总重量,纺丝溶液优选包含 5% 重量比至 90% 重量比的疏水性聚合物材料。

[0025] 当在 60℃ 至 200℃ 下进行热处理时完成压延步骤。

[0026] 优选通过等离子处理进行表面改性。

[0027] 使用氧气或氩气进行等离子处理。

[0028] 优选使等离子处理进行 30 秒至 300 秒。

[0029] 优选地,膜的平均孔径为 0.1 μm 至 1.0 μm 、厚度为 30 μm 至 200 μm 以及孔隙率为大于等于 60%。

[0030] 根据另一方面,提供了根据所述方法制备的用于 Western 印迹的膜。

[0031] 技术效果

[0032] 因此,本发明的用于制备 Western 印迹的膜的制备工艺简单,这样能以低成本大批量生产,相比传统的采用膜分离和分析的蛋白质或多种应用,本发明提供出色的灵敏度,可用于检测的用途。

[0033] 附图简述

[0034] 图 1 为根据本发明实施例 1 制备的 PVdF 膜的一组扫描电子显微图。(a) 1K $\times$ 放大率; 以及 (b) 10k $\times$ 放大率。

[0035] 图 2 为根据本发明实施例 4 制备的等离子 - 处理的 PVdF 膜的一组扫描电子显微图。(a) 使用等离子处理 30 秒; (b) 使用等离子处理 60 秒; (c) 使用等离子处理 150 秒; 以及 (d) 使用等离子处理 300 秒。

[0036] 图 3 和图 4 为示出根据本发明实施例 4 制备的等离子 - 处理的 PVdF 膜的接触角和抗张强度的图。

[0037] 图 5 为示出在本发明实施例 1 和对比实施例中制备的各个膜的尺寸的一组图。(a) 对比实施例; 以及 (b) 实施例 1。

[0038] 图 6 为在本发明实施例 1 和对比实施例中制备的各个膜的横截面的一组扫描电子显微图。(a) 对比实施例; 以及 (b) 实施例 1。

[0039] 图 7 示出在本发明实施例和对比实施例中制备的膜的空气中 TGA 分析的结果。(a) 对比实施例; (b) 实施例 1 (PVdF HSV 900); (c) 实施例 2 (PVdF 761); 以及 (d) 实施例 3 (PVdF 761/2801)。

[0040] 图 8 示出使用在本发明实施例 1 和对比实施例中制备的各个膜而进行的 Western 印迹的结果。

[0041] 图 9 和图 10 示出使用本发明实施例 1 至 4 中制备的各个膜而进行的 Western 印迹的结果。

[0042] 图 11 为示出在 Western 印迹后膜脱色的照片。

[0043] 发明详述

[0044] 为了制备本发明的用于 Western 印迹的纳米纤维膜, 将诸如 PVdF 聚合物的疏水性聚合物以其能纺丝的浓度而溶解在溶剂中, 由此制备纺丝溶液。将纺丝溶液传送至喷丝头喷嘴, 然后通过向喷嘴施加高电压而对纺丝溶液进行电纺丝。使由电纺丝制备的纳米纤维网经过压延过程, 由此制备平均孔径为 0.1 μm 至 1.0 μm 、平均纤维直径为 50nm 至 1000nm 且厚度为 30 μm 至 200 μm 的膜。

[0045] 该纳米纤维膜甚至在其未经过甲醇预处理的情况具有优异的灵敏性, 并因此其能用于蛋白的分离和检测。其还可以在使用前经过包括等离子处理的各种表面改性过程以使其表面亲水化。

[0046] 在下文中, 将详细地描述本发明的制备纳米纤维膜的方法的各个步骤。

[0047] 制备含疏水性聚合物的纺丝溶液的步骤

[0048] 将疏水聚合物 (例如 PVdF) 以其能纺丝的浓度而溶解在适合的溶剂中, 由此制备纺丝溶液。在纺丝溶液中的聚合物材料 (PVdF) 含量优选为 5% 重量比至 90% 重量比。若在纺丝溶液中聚合物材料的含量小于 5% 重量比, 则当对纺丝溶液进行电纺丝时, 其将形成小珠而非形成纳米纤维, 因此使其难于制备膜。在另一方面, 若聚合物材料的含量大于 90%, 则其将因为纺丝溶液粘度高而难以形成纤维。因此, 尽管纺丝溶液的制备不受特别地限制, 但其优选将纺丝溶液中聚合物浓度设定在能够易于形成纤维结构的浓度, 由此控制纤维形态。

[0049] 形成聚合物纳米纤维网的步骤

[0050] 使用计量泵将上述制备的纺丝溶液转移至纺丝袋,然后使用高压控制器通过向纺丝袋施加高压来进行电纺丝。因此,使用的电压可调节在 0.5kV 至 100kV 之间,并且作为集电板,可以将电导金属或离型纸 (release paper),并且其可以在使用前接地或带负电荷。集电板优选和与其连接的吸入式收集器一起使用,从而在纺丝期间有助于捆扎纤维。

[0051] 在静电雾化中,纺丝袋和集电板之间的间隔优选控制为 5cm 至 50cm,并且使用计量泵以 0.0001cc/洞·分钟至 5cc/洞·分钟的速率排放纺丝溶液。此外,在能控制温度和湿度的室中,优选在为 30%至 80%的相对湿度下进行电纺丝。按照上述进行纺丝的纳米纤维网的平均纤维直径为 50nm 至 1000nm。

[0052] 除了电纺丝,能使用电雾化、电吹制纺丝、离心电纺丝、快速电纺丝、气泡电纺丝、熔融电纺丝或非针电纺丝进行纺丝过程。

[0053] 压延聚合物纳米纤维网的步骤

[0054] 上述纺丝的聚合物纳米纤维网通过包括加压、压缩、滚压、热板压延、热粘合、超声波粘合、缝口密封带法和层压在内的各种方法进行压延,由此获得压延的膜。因为获得的聚合物纳米纤维网具有三维开放式孔结构,所以其甚至在未经过甲醇预处理过程的情况下仍能够提供具有超高灵敏性的膜。

[0055] 因此,膜的厚度为 30 μm 至 200 μm 且平均孔径为 0.10 μm 至 1.0 μm 。若膜的厚度小于 30 μm ,则其由于在 Western 印迹期间硬度低而难于操作,并且若其的厚度大于 200 μm ,则将增加制备成本。此外,若膜具有小于 0.1 μm 的平均孔径,则后处理过程成本将提高,并且将会延迟转移时间,并且若其平均孔径大于 1.0 μm ,则能转移浓度降低,从而不能实现准确地蛋白分析。

[0056] 特别地,当进行压延时,还可以与压延同时进行热处理。压延中的热处理温度优选为 60°C 至 200°C,在该温度范围下聚合物不会熔融。若压延中的热处理温度低于 60°C,则纳米纤维间的粘合将不牢固,从而将发生纳米纤维间的分离,由此使其以适当的方式进行 Western 印迹,以及若热处理温度高于 200°C,则通过将组成纳米纤维的聚合物(例如, PVdF) 熔融而使孔结构封闭,从而蛋白不能从 SDS-PAGE 凝胶转移至膜,由此使其不能实现准确的分析。

[0057] 修饰纳米纤维表面的步骤

[0058] 使用各种方法能够修饰纳米纤维的表面结构,所述方法包括:包括使用溶剂除去 WBL(弱边界层)、然后溶胀和表面蚀刻的化学方法;通过诸如 X 射线、Y 射线或电子束的电离辐射来诱发表面反应的光化学修饰方法;在真空下使用电晕放电或诸如等离子、电子束或粒子束的高能原子或分子离子来诱发表面氧化反应的物理修饰方法;以及使用火焰或臭氧的方法。

[0059] 在本发明中,在这类表面改性方法之间,将当具有低环境负载和优异表面改性作用时为最简单的等离子处理用于使纳米纤维表面亲水化,由此提供用于超高灵敏性 Western 印迹的膜。

[0060] 在等离子处理中的变量可包括所用的气体的类型和流速、处理压力、处理时间、电功率等。优选地,确定适于纳米纤维表面改性的条件。

[0061] 即,在等离子处理过程中可将氧气 (O_2) 或氩气 (Ar) 用作处理气体。在本发明中,优选使用具有蚀刻和交联作用的氩气。

[0062] 等离子处理优选在 400W 的功率下进行 30 秒至 300 秒。若等离子处理时间短于 30 秒,则膜的亲水化程度将不充分,因此当进行 Western 印迹时,膜将具有与缓冲溶液的较差相容性,并且出现背景的几率将非常高。若等离子处理时间长于 300 秒,则膜将长期暴露于等离子,将会使膜的物理性质变差,而非改善,并且将增加过程成本。功率和处理时间彼此成反比,并且因此,当功率增加时能缩短等离子处理时间。

[0063] 在下文中,将进一步详细描述本发明。然而,应理解,这些实施例仅为示例性目的,并不应解释为限制本发明的范围。

[0064] 实施例 1

[0065] 相对于溶液的总质量,以 20% 重量比来将疏水性均聚物 PVdF (HSV 900) 溶解在溶剂 DMAc 中,由此制备纺丝溶液。使用计量泵将纺丝溶液转移至喷丝头喷嘴,然后在下列条件下进行电纺丝,由此获得 PVdF 纳米纤维网:施加的电压:25kV;喷丝头和集电器之间的间隔:20cm;每分钟放电量:0.005cc/g·洞/分钟;室温和大气压。

[0066] 图 1 为纺丝的 PVdF 纳米纤维网的扫描电子显微图。如图 1 所示,纺丝的纳米纤维的平均纤维直径为约 300nm 至 400nm。此外,纳米纤维具有相对均匀的孔径和三维开放式孔结构。

[0067] 将纺丝的 PVdF 纳米纤维网通过使其经过加热至 140℃ 的热板轧辊而压延,由此制备 PVdF 纳米纤维膜。由压延产生的膜具有约 80 μm 的厚度。

[0068] 实施例 2 和 3

[0069] 在实施例 2 和 3 中,以与实施例 1 中相同的方法,单独将疏水性均聚物 PVdF (761) (实施例 2) 或电纺丝均聚物 PVdF (761) 和共聚物 PVdF (2801) 的 50 : 50 (w/w) 混合物 (实施例 3) 进行电纺丝,然后压延,由此获得纳米纤维膜。将实施例 2 和 3 中制备的膜经过 TGA、XRD、SEM 和 DSC 分析与对比实施例中制备的膜进行对比。在热重量分析 (TGA) 的结果中,对比实施例和实施例中制备的样品表现出基本相同的结果,并且表现出 PVdF 聚合物的典型特性。这些结果在下面“膜的结构分析”部分描述。

[0070] 实施例 4

[0071] 在实施例 4 中,使用等离子清洁器系统,使实施例 1 中制备的 PVdF 纳米纤维膜经过表面改性。当供给 100sccm 的氩气时,在 400W 下分别进行 30 秒、60 秒、150 秒和 300 秒的表面改性。

[0072] 图 2 为示出根据等离子处理时间而等离子处理的实施例 4 的 PVdF 膜的表面结构的一组扫描电子显微图。如在图 2 中所示,随着等离子处理时间的延长,在 PVdF 纳米纤维表面上出现的裂缝尺寸增加。这认为是由于纳米纤维表面因等离子处理而蚀刻。

[0073] 图 3 示出根据等离子处理时间而进行等离子处理的 PVdF 膜的水接触角。如图 3 所示,PVdF 膜的水接触角由于等离子处理而降低。即,膜由于等离子处理而表现出亲水性质。随等离子处理时间的延长,膜的亲水性质提高。当将膜等进行离子处理 30 秒时,膜的亲水性质变化最大。

[0074] 图 4 示出根据等离子处理时间而进行等离子处理的实施例 4 的 PVdF 膜的抗张强度。如图 4 中所示,随着等离子处理时间的延长,抗张强度表现出降低的趋势。这说明随着等离子处理时间延长,膜的物理性能由于等离子处理而变差。

[0075] (对比实施例)

[0076] 为了对比,使用通过相分离而制备的商购 PVdF 膜 (PALL CO., LTD., BioTrace™ PVdF)。采用的 PVdF 膜的厚度为 150 μm 且平均孔径为 0.45 μm。

[0077] 图 5 示出实施例 1 和对比实施例中制备的各个膜的平均孔径,其中使用 PMI 毛细流孔隙率仪来测量平均孔隙直径。如图 5 中所示,实施例 1 的纳米纤维膜表现出非常均匀的平均孔径(图 5b),而对比实施例的商购膜表现出非常不均匀的平均孔隙直径(图 5a)。

[0078] 图 6 示出对比实施例(a)和实施例 1(b)中各个膜的横截面的扫描电子显微图。

[0079] 如对比实施例的图 6(a)所示,商购膜具有二维封闭的孔结构,因为其使用相分离而制备的。然而,如实施例 1 的图 6(b)所示,纳米纤维膜当其制备出时表现出三维开放式孔结构。

[0080] (膜结构的分析)

[0081] 通过 DSC、XRD、TGA 和 SEM 进行实施例 1 至 3 制备的各个膜和对比实施例中制备的商用膜的结构分析。如在图 6a 中所示,扫描电子显微照相技术(SEM)的结果说明对比实施例的膜具有非均匀的孔径和闭合的孔结构。

[0082] 图 7 示出各个膜的热重量分析(TGA)的结果。如图 7 所示,对比实施例 1 的商用膜和实施例 1 至 3 的膜在约 500℃或更低的温度下在空气中未分解。然而,观察到实施例 1 至 3 的膜对比实施例的膜更热稳定。

[0083] 同时,为了测定实施例 1 和对比实施例的各个膜的孔隙率,从各个膜中采集 1cm(宽)×1cm(长)的样品,并且根据下列方程(1)测量各个样品的孔隙率:

[0084]

$$\text{孔隙率}(\%) = \left(\frac{\rho_0 - \rho}{\rho_0} \right) \times 100(\%) \quad \dots\dots\dots(1)$$

[0085] 其中 ρ_0 为 PVdF 的密度 (1.76g/cm³),并且 ρ 为测量的密度值。

[0086] 根据上述方程获得的孔隙率对于实施例 1 为 73.3%,且对于对比实施例为约 67%,说明根据实施例 1 的方法制备的膜的孔隙率对比实施例的膜高约 10%。

[0087] (测试实施例 1:Western 印迹)

[0088] 通常,在进行 Western 印迹之前,膜需要通过使用 100%甲醇对其进行处理而部分地亲水化。该过程增加了膜与 Western 缓冲液的相容性,从而在凝胶中易于发生膜与蛋白的相互作用。

[0089] 在该测试实施例中,在未进行膜的部分亲水化处理的状态下使用实施例 1 和对比实施例的膜进行 Western 印迹。

[0090] 首先,将在实施例 1 和对比实施例中制备的各个膜切割为 6cm(宽)×8cm(长)的尺寸,然后使用切割后的膜进行 Western 印迹而不用甲醇处理该膜。为此,将各个切割的膜转移至 1× 转移缓冲液,然后静置 10 分钟。此时,转移缓冲液包含 3.03g/L Tris-碱、14.4g/L 甘氨酸和 20%的甲醇 (200ml/L)。将待转移的凝胶浸入转移缓冲液中,持续短暂的时间,并且放置在各个膜上,同时注意不要产生气泡。使凝胶开始与膜接触,将已由转移缓冲液湿润的 3M 纸涂覆于生成的膜的两侧,然后将膜放置在转移试剂盒中。

[0091] 使用 Mini-gel 转移试剂盒,在 100V 下,进行蛋白向膜的转移,持续 1 小时。同时,为了减少热量的产生,在将转移试剂盒放置在冰上的情况下进行转移。在完成转移之后,将

膜从试剂盒中分离并使用 $1 \times$ TBST (具有 0.05% 吐温 20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲的盐水) 洗涤。此时, TBST 包含 0.2M 的 pH 为 8 的三羟甲基氨基甲烷 (24.2g Trisma 碱) 和 1.37M NaCl (80g NaCl), 通过浓 HCl 将 pH 调节至 7.6。

[0092] 由此, 在 20 μ g、10 μ g、5 μ g、2.5 μ g 和 1 μ g 的浓度下使用纯化的蛋白抗体, 并且使用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶。总转移时间为约 100 分钟, 并且滞留时间 (blocking time) 为 90 分钟。

[0093] 作为第一抗体, 使 β -肌动蛋白 (Santa cruz, sc-47778) 进行 5000 倍稀释, 并使其在 -4°C 与转移膜反应约一天 (24 小时)。使用 X 射线胶片来观察转移至膜的蛋白的表达。

[0094] 图 8 示出使用实施例 1 和对比实施例中制备的膜进行 Western 印迹的结果。如图 8 所示, 在商购膜的情况下, 当未使用甲醇对膜进行处理时, 不能观察到蛋白的表达。然而, 在实施例 1 的膜 (等经离子未处理的) 的情况下, 清晰地观察到蛋白的表达。这是由于实施例 1 的膜表现出毛细现象, 因为其具有三维开放式孔结构, 其中孔由于电纺丝而从膜的一个表面延伸至其它表面。

[0095] 此外, 认为与对比实施例的膜相比, 实施例 1 的膜孔径均匀且由于孔隙率高因而产生的比表面积大, 因此表现出优异的灵敏性。特别地, 因为使用相分离制备对比实施例的商购膜, 所以认为商购膜将必然具有二维封闭开口结构, 因此与实施例 1 的纳米纤维膜相比灵敏性低。

[0096] (测试实施例 2: Western 印迹)

[0097] 使用在实施例 1 和 4 中制备的 PVdF 纳米纤维膜, 以与测试实施例 1 相同方式进行 Western 印迹。在进行 Western 印迹之前, 使用 100% 甲醇对各个膜处理 1 分钟, 并且用等离子处理 30 秒、60 秒、180 秒或 300 秒或者不用等离子处理 (等离子处理时间: 0 秒)。

[0098] 图 9 示出使用实施例 1 和 4 中制备的各个膜进行 Western 印迹的结果。如图 9 所示, 在未用等离子处理 (等离子处理时间: 0 秒) 的实施例 1 的膜的情况下, 使用甲醇 (MeOH) 处理的膜与未用甲醇处理的膜相比表现出的蛋白表达高。然而, 当使用等离子分别处理实施例 4 的膜 30 秒、60 秒、180 秒和 300 秒的情况下, 未用甲醇处理的膜与用甲醇处理的膜相比表现出的蛋白表达高。这认为是因为当已经通过等离子处理而表面-亲水化的膜由甲醇进行处理时, 表面亲水性变得过度, 因此干扰了在膜和蛋白间的疏水相互作用。

[0099] (测试实施例 3: Western 印迹)

[0100] 为了观察等离子处理的膜随时间的变化, 使实施例 1 和 4 中制备的 PVdF 纳米纤维膜在室温下静置 3 个月, 然后以与测试实施例 1 和 2 相同的方式使用膜进行 Western 印迹。在图 10 中示出 Western 印迹的结果。

[0101] 如图 10 所示, 即使在用等离子处理膜之后的 3 个月, 所获得到与测试实施例 2 的结果仍相同。这说明用氩等离子处理的纳米纤维的表面结构未随时间显著改变。

[0102] 在测试实施例 2 和 3 的情况下, 当等离子处理时间为 30 秒时, 更清楚地观察到蛋白表达。如图 11 所示, 这是因为当等离子处理时间大于 60 秒时, 膜的表面亲水化变得过度, 因此当进行 Western 印迹时, 膜变为黄色。这归因于膜和 Western 印迹缓冲液中包含的材料之间的相互作用, 但在进行 Western 印迹时未造成显著问题。

[0103] 此外, 如在图 9 和 10 的结果所示, 与用甲醇处理的样品的情况相比, 用等离子处理的样品的情况中, 蛋白表达更明显。这说明与甲醇处理相比, 等离子处理更均匀地修饰纳米

纤维的表面结构。

[0104] 特别地,本发明的纳米纤维膜与现有商购膜相比更有效地吸收蛋白。这认为是由于纳米纤维的比表面积大和由于其三维开放式孔结构而产生的毛细效应。此外,如图 6 所示,这是因为纳米纤维膜与现有的商购膜相比具有均匀的孔结构。

[0105] 因此,在本发明的纳米纤维膜中,即使在未通过甲醇处理而亲水化时仍发生蛋白表达。此外,当其通过等离子处理而亲水化并用作 Western 印迹用的膜时,其具有优异的灵敏性,而且不具有背景。

[0106] 如上所述,本发明的膜尤其能用作 Western 印迹用的膜。此外,其能用作包括蛋白分离、分析、检测和诊断在内的各种领域中的膜。

[0107] 因此,本发明的用于 Western 印迹的膜通过简单方法而制备,因此能以低成本大量制备。此外,其与现有的膜相比提供了优异的灵敏性,因此能用于包括蛋白分离、分析和检测在内的各种应用。

[0108] 尽管为了示例性目的而描述了本发明的优选实施方案,但本领域技术人员应认识到各种改进、增加和替换是可能的,这不背离随附的权利要求中所公开的本发明的范围和主旨。

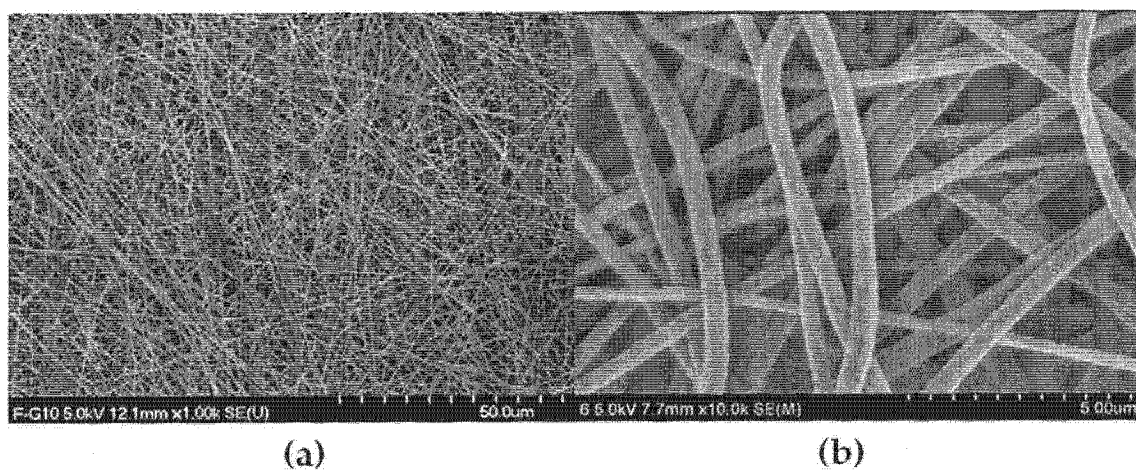


图 1

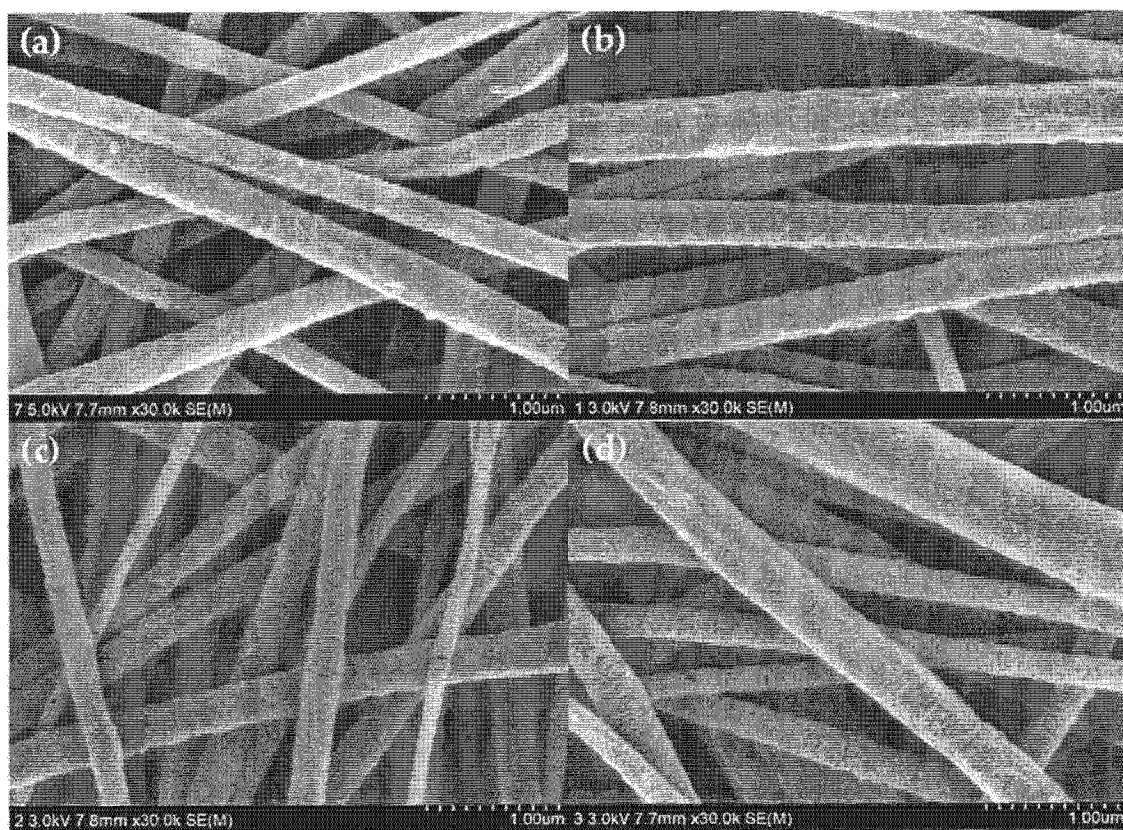


图 2

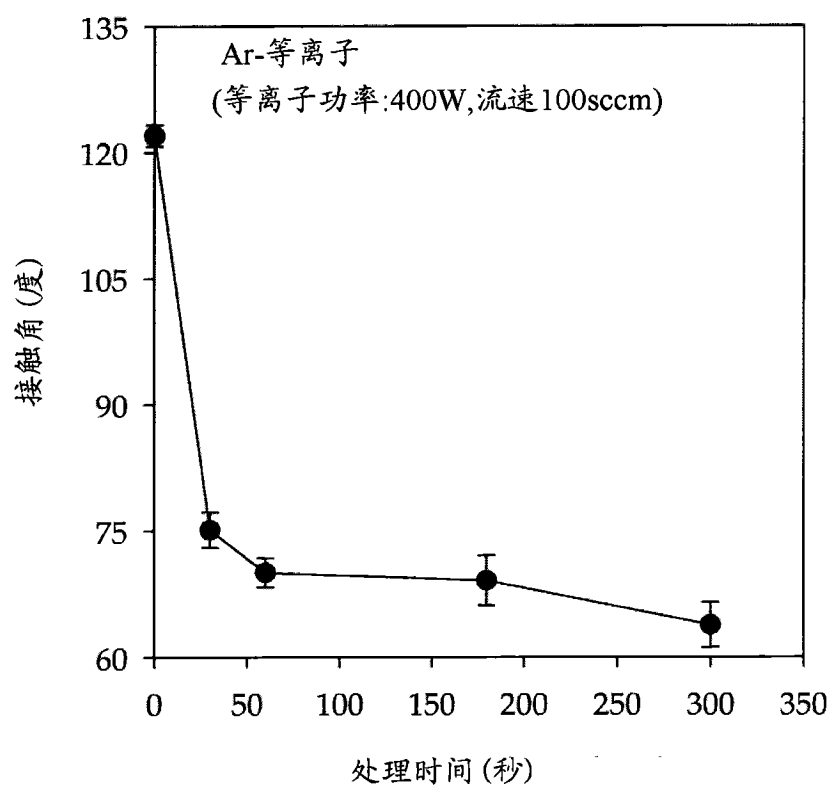


图 3

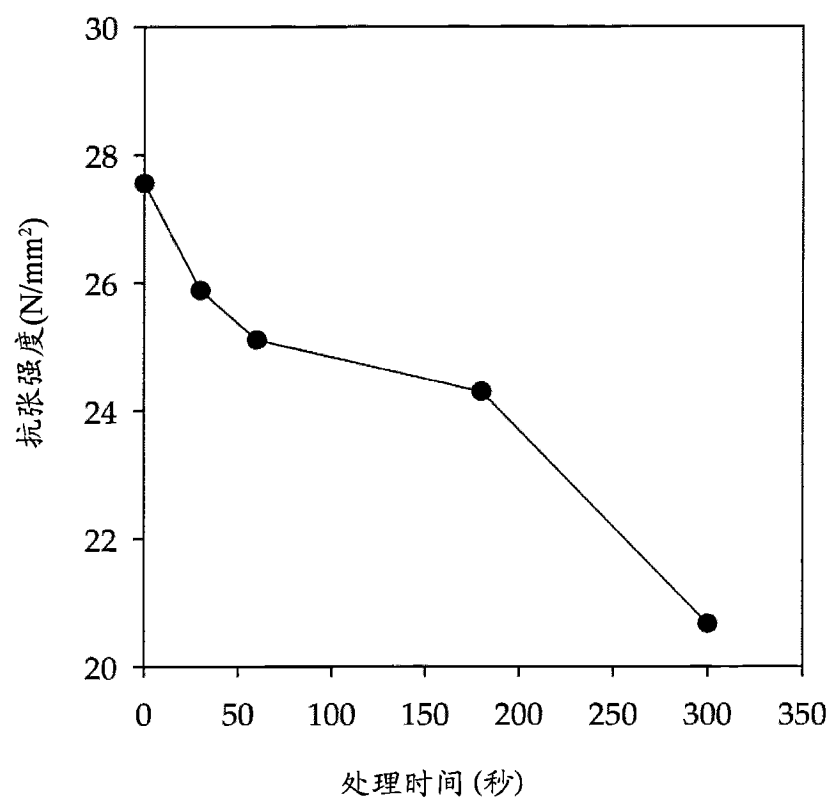


图 4

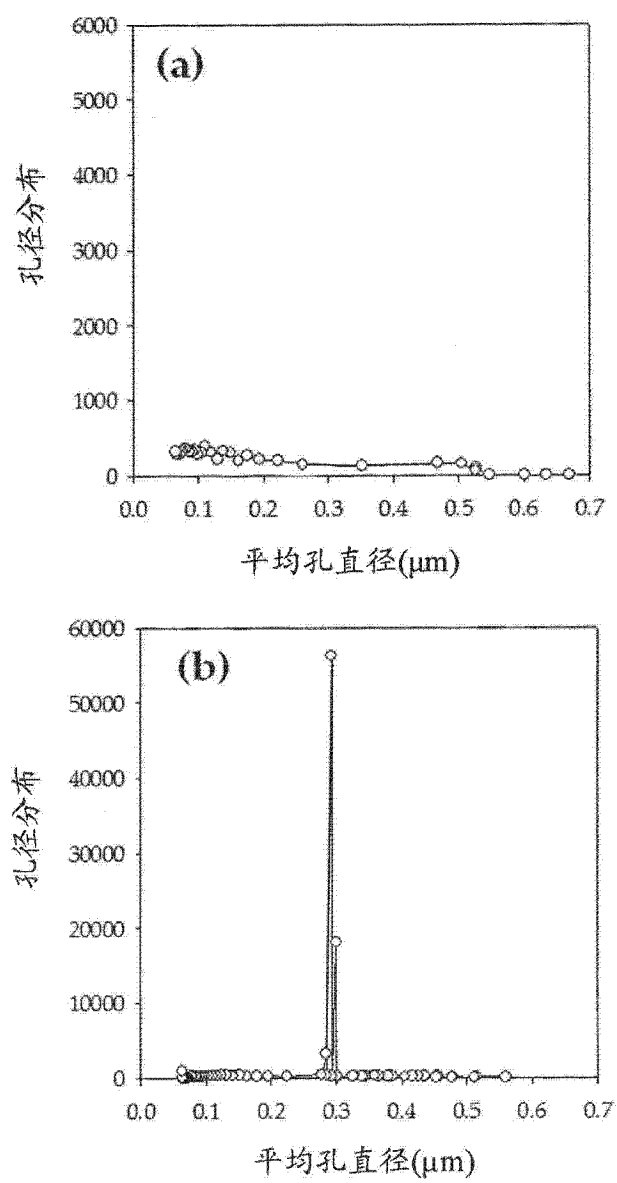


图 5

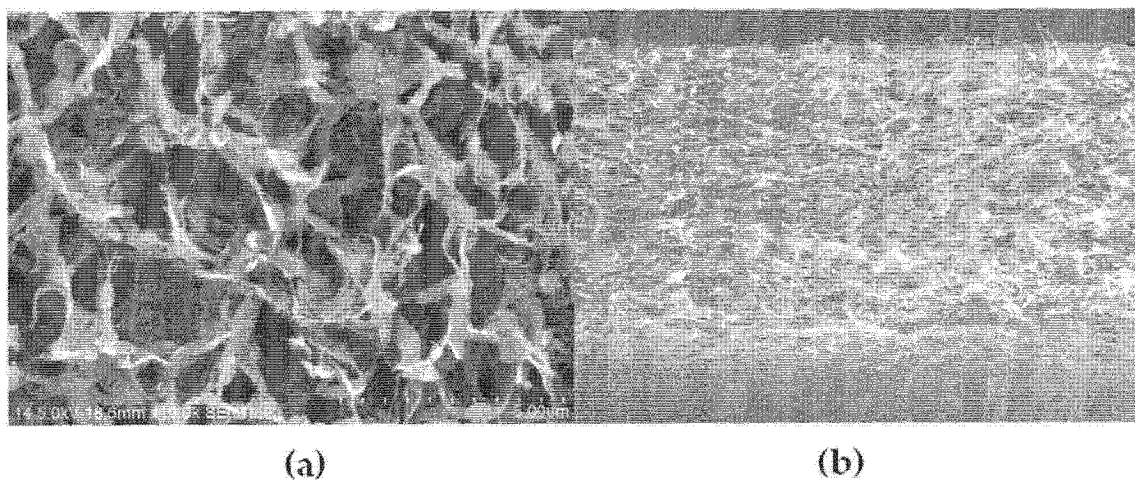


图 6

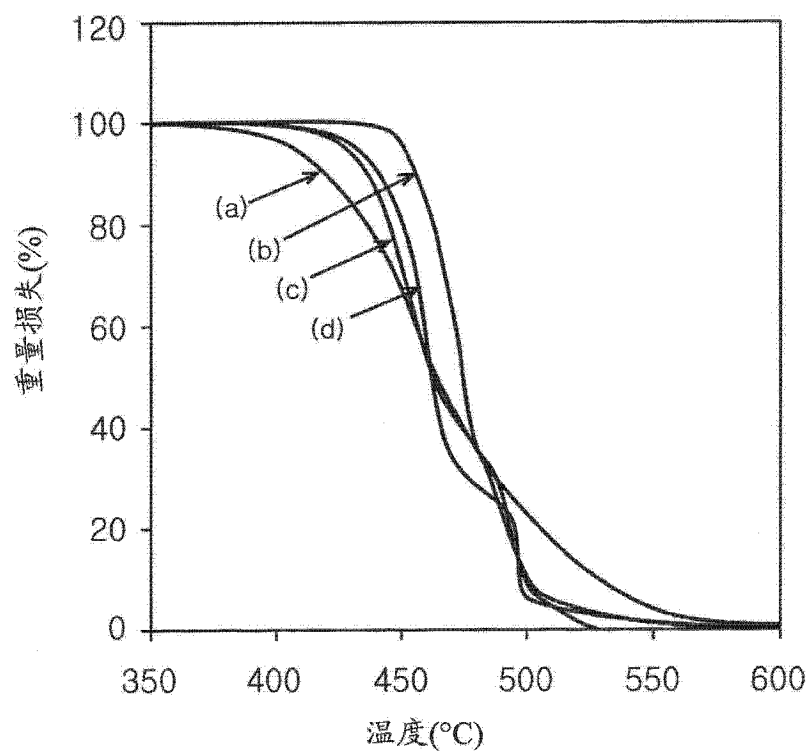


图 7

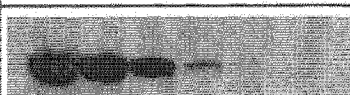
暴露时间 (分钟)	MeOH未活化	
	商购膜	等离子未处理
1		
3		
10		

图 8

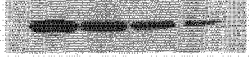
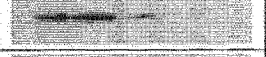
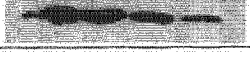
等离子处理 时间(S)	MeOH处理	暴露时间(分钟)		
		1	3	10
0	处理的			
	未处理的			
30	处理的			
	未处理的			
60	处理的			
	未处理的			
180	处理的			
	未处理的			
300	处理的			
	未处理的			

图 9

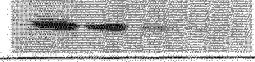
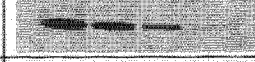
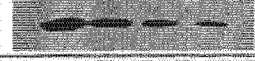
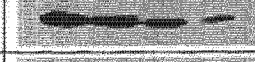
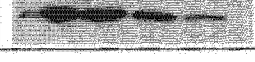
等离子处理 时间(S)	MeOH处理	暴露时间(分钟)		
		1	3	10
0	处理的			
	未处理的			
30	处理的			
	未处理的			
60	处理的			
	未处理的			
180	处理的			
	未处理的			
300	处理的			
	未处理的			

图 10

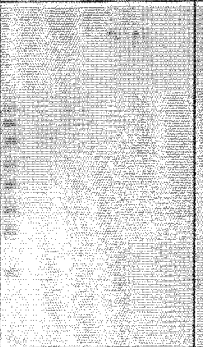
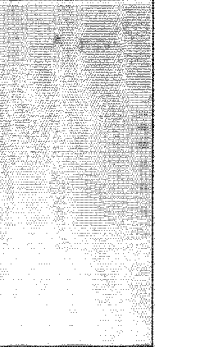
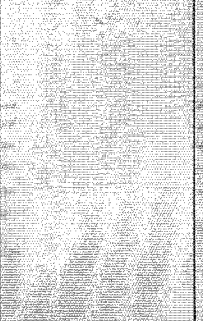
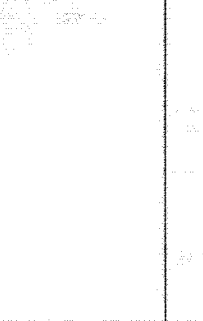
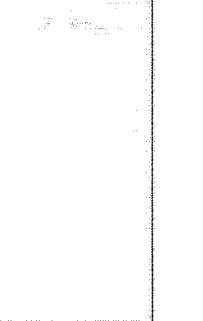
处理时间	0秒	30秒	60秒	180秒	300秒
用甲醇处理					
未用甲醇处理					

图 11